

# CIRURGIAS EXPERIMENTAIS E PONTO FINAL HUMANITÁRIO EM BIOMODELOS ANIMAIS

*Data de aceite: 03/07/2023*

### **Wesley Lyeverton Correia Ribeiro**

Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,  
Ceará  
ORCID 0000-0002-2784-0013

### **Cayo Antônio Soares de Almeida**

Universidade Federal do ABC, Santo  
André, São Paulo  
ORCID 0000-0003-4562-192X

### **Augusto César Aragão Oliveira**

Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,  
Ceará  
ORCID 0000-0003-0253-1545

biológica e na Medicina e é um assunto de frequentes debates na sociedade (BARRE-SINOUSI, MONTAGUTELLI, 2015). Nessa perspectiva, experimentos científicos utilizando animais contribuíram significativamente para o desenvolvimento de vacinas, antibióticos e para a compreensão dos processos que envolvem as doenças humanas. Assim, modelos animais são úteis para o conhecimento sobre ação de medicamentos e efeitos de intervenções cirúrgicas nos organismos (FERREIRA, HOCHMAN, BARBOSA, 2005; SINGH, SEED, 2021).

No campo da cirurgia experimental, os animais foram fundamentais no desenvolvimento de diversos protocolos. Esses biomodelos foram usados, por exemplo, na obtenção de novas técnicas cirúrgicas como a traqueostomia, inicialmente realizada por Ibn Zuhr, em cabras, no século XII (ABDEL-HALIM, 2005), e a laparoscopia, originada do trabalho de Georg Kellings com cães no século XX (SCHOLLMEYER *et al.*, 2007). Na década de 1940, Vivien Thomas e

## 1 | INTRODUÇÃO

O uso de animais para as mais diversas necessidades humanas foi fomentado, ao longo da história, por reflexões éticas, filosóficas e religiosas. Conceitos construídos nos últimos séculos foram substanciais para o aprofundamento da discussão sobre a relação homem-animal, sobretudo no que diz respeito ao uso de biomodelos pela ciência.

O uso de animais para fins científicos é uma prática de longa data na pesquisa

Alfred Blalock desenvolveram um modelo canino que mimetizava a tetralogia de Fallot (TOF), permitindo o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas para repará-la, sendo este o tratamento de escolha até hoje (HINES, 2019).

Além de serem historicamente importantes para o desenvolvimento de inúmeras técnicas cirúrgicas, biomodelos vivos e cadáveres de animais têm sido utilizados como meio de ensinar e melhorar a habilidade cirúrgica de profissionais (LOH *et al.*, 2018). Embora existam modelos que se propõem a substituir o uso de animais nessas práticas, como o uso de simuladores de realidade virtual, a utilização de animais vivos ainda é o padrão-ouro na formação técnica em microcirurgias, na medida em que dá aos profissionais em formação uma experiência realista e aumenta a sua preparação para o ambiente clínico, pois oferece fisiologia semelhante à real prática em humanos, no que diz respeito, por exemplo, ao fluxo sanguíneo, perfusão, trombose e manipulação de outras estruturas circundantes, como ossos e músculos (JAVID *et al.*, 2019).

Dentre as espécies de animais, roedores das espécies *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* são as mais amplamente utilizadas pela ciência atualmente (GRAF, CINELLI, ARRAS, 2016). As justificativas para uso desses biomodelos incluem o fácil manejo, quando comparado àqueles de maior porte; homologia anatômica, fisiológica e genética (BARRE-SINOUSI, MONTAGUTELLI 2015). Na execução dos diversos testes experimentais relacionados às doenças, protocolos cirúrgicos podem ser necessários em muitos casos, seja para indução de um modelo de interesse ou para coleta de tecidos a serem analisados (GRAF, CINELLI, ARRAS, 2016).

O treinamento técnico do profissional deve preceder qualquer procedimento cirúrgico, mesmo os mais simples (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2011; MIWA, SLADKY, 2016). A capacitação técnica é necessária para garantir a qualidade dos testes e o adequado manejo da dor ou sofrimento nos animais, caso ocorram. Assim, diversas resoluções normativas, diretrizes e leis que regulamentam protocolos experimentais em todo o mundo exigem treinamentos prévios e aquisição de habilidades para assegurar o bem-estar animal (GRAF, CINELLI, ARRAS, 2016; BARRE-SINOUSI, MONTAGUTELLI, 2015).

Na condução de protocolos cirúrgicos, o pesquisador deve não somente conhecer a anatomia e comportamento natural da espécie utilizada, mas receber treinamento em assepsia, adquirir habilidade para manuseio e dissecação de tecidos e órgãos, além de fazer uso adequado de instrumentos e ser capaz de identificar condições clínicas apresentadas pelo animal no pré, trans e pós-operatório (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2011; MIWA, SLADKY, 2016). Essas habilidades são essenciais para definir a melhor conduta a ser adotada, desde a preparação do animal até seu completo restabelecimento. Destaca-se, ainda, que o pesquisador deve ser capaz de avaliar as condições de bem-estar animal durante todo o procedimento e, caso seja necessário, colocar em prática o ponto final humanitário, diante de intercorrências cirúrgicas irreversíveis, como será discutido mais adiante.

## 2 | PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DE ROEDORES SUBMETIDOS A PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Inicialmente, cabe-nos sublinhar que todo procedimento cirúrgico deve ser precedido de ampla consulta à literatura, visando ao emprego de técnicas minimamente invasivas e refinadas, as quais, normalmente, requerem menos anestesia, analgesia e produzem menos complicações pós-operatórias. Além disso, procedimentos refinados podem ser tecnicamente mais fáceis de serem executados e estão em consonância com as diretrizes dos 3Rs.

Essencialmente, a avaliação dos parâmetros clínicos em biomodelos submetidos a procedimentos cirúrgicos deve acontecer durante três momentos: períodos pré-operatório, transoperatório e pós-operatório. Em todas essas fases, é imprescindível que o bem-estar animal seja assegurado e que sejam utilizados todos os recursos possíveis na tentativa de evitar/minimizar a dor e o sofrimento.

### 2.1 Pré-operatório

No período pré-operatório, a realização de exames clínicos, incluindo observações comportamentais, antes da indução anestésica, é essencial. Por exemplo, a presença de secreções nos olhos ou nariz, emaranhados de pelos ou de sujeira na região perianal requerem investigação adicional. Se a aparência geral do animal for anormal ou algum dos sinais clínicos não estiver dentro da normalidade para a espécie, a indução da anestesia deve ser adiada até que o quadro seja revertido ou o animal seja retirado do estudo. Ademais, é útil monitorar a ingestão de alimento, água e peso corporal por alguns dias antes do procedimento, pois isso permitirá obtenção de parâmetros relevantes que podem ser comparados aos coletados no momento da recuperação do animal no pós-operatório (FLECKNELL, 2015).

Navarro *et al.* (2021) apresentam os principais parâmetros a serem avaliados no exame físico pré-anestésico e os achados que indicam um camundongo saudável ou com sinais clínicos de doenças (Quadro 1).

Parâmetro	Achados normais em camundongos saudáveis	Achados anormais, indicando doença sistêmica e mau estado físico
<b>Aparência geral</b>	Ativo, curioso, pelagem com aparência normal	Letárgico, curvado
<b>Função respiratória</b>	Respiração não perceptível, sem descarga nasal	Taquipneia, respirações abdominais profundas, respirações superficiais, respiração com boca aberta ou respiração ofegante
<b>Membrana mucosa ou coloração da pele</b>	Rósea	Pálida, azulada ou vermelho brilhante
<b>Hidratação</b>	Turgor de pele normal	Olhos afundados, piloereção, teste de turgor cutâneo tardio
<b>Escore de condição corporal<sup>2</sup></b>	2,5 – 3	Obesidade: ECC de 5; magro e em mau estado, com pelve e coluna óssea: ECC < 2

Quadro 1. Parâmetros a serem avaliados no exame físico de camundongos no pré-cirúrgico<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Adaptado de Navarro *et al.* (2021). <sup>2</sup>O Escore de Condição Corporal (ECC) varia de 1 a 5, sendo utilizado para avaliação da saúde do animal baseado em atributos físicos. Alterações no ECC podem se dar em decorrência do sexo, linhagem ou modelos de doenças nos animais. A descrição pormenorizada da escala relativa ao ECC para camundongos foi apresentada por Ullman-Culleré, Foltz (1999).

## 2.2 Transoperatório

Existe uma série de protocolos anestésicos e analgésicos que devem ser considerados conforme a espécie e o objetivo da cirurgia. No período transoperatório, é essencial que o animal seja mantido em plano anestésico adequado. Neste capítulo, nós nos deteremos apenas aos principais parâmetros de avaliação clínica dos roedores durante a realização de procedimentos cirúrgicos.

### a. Resposta aos estímulos dolorosos

A resposta aos estímulos dolorosos é uma estratégia de avaliação essencial para se estimar a profundidade da anestesia. Em roedores, ao pinçamento da membrana interdigital, o reflexo de retração da pata deve ser avaliado. Se o membro for retraído, ou houver vocalização do animal, tais sinais são indícios de que o plano anestésico é inadequado para realização de procedimentos cirúrgicos.

### b. Alteração nos reflexos oculares

A técnica de avaliação do reflexo palpebral e da posição do globo ocular é limitada para ratos e camundongos, pois, dependendo do protocolo utilizado, a perda desse reflexo pode ser observada em níveis anestésicos mais leves, como acontece com a anestesia com cloridrato de cetamina, por exemplo. Ademais, a posição do globo ocular e o grau de dilatação da pupila variam conforme a espécie e o anestésico utilizado, reforçando o fato de

não serem considerados como indicadores seguros de profundidade anestésica em ratos e camundongos (FLECKNELL, 2015).

#### c. Função cardiorrespiratória

A função respiratória deve ser avaliada antes da anestesia, para que alterações de padrão, profundidade e frequência respiratória (FR) possam ser comparadas após a indução anestésica. A frequência e o padrão respiratório devem ser cuidadosamente monitorados como indicadores da profundidade anestésica. Um padrão respiratório muito superficial pode indicar que o plano anestésico é muito profundo. Por outro lado, uma frequência respiratória muito elevada pode indicar que o animal está em um plano anestésico muito superficial e que, possivelmente, esteja sentindo dor (NAVARRO *et al.*, 2021).

Pequenas alterações na FR e na frequência cardíaca (FC) em roedores são indicadoras de alterações profundas e sinais precoces de complicações. É necessário que haja prevenção de hipercapnia, hipoxemia, bradicardia e hipotensão. Neste sentido, equipamentos simples, como estetoscópio e ultrassom Doppler, podem fornecer informações relevantes. O Doppler pode permitir o monitoramento audível da FR e RC. O eletrocardiograma (ECG) pode ser usado para avaliar possíveis alterações do ritmo e FC (BENNETT, LEWIS, 2022).

#### d. Perfusão tecidual e oxigenação

A perfusão sanguínea e a oxigenação podem ser monitoradas por meio da avaliação da cor da membrana mucosa, contudo, isso não é tão evidente em ratos e camundongos. Nessas espécies, deve-se considerar a cor geral da pele das orelhas, cauda e almofadas das patas. Em camundongos albinos com níveis normais de perfusão e oxigenação, essas áreas têm coloração rosada. Entretanto, podem ficar pálidas na ocorrência de vasoconstrição, hipotensão, hipovolemia ou hipóxia, ou ainda adquirir coloração rosa escura em casos de vasodilatação, hipercapnia ou alterações tóxicas (NAVARRO *et al.*, 2021).

A falta de alteração de coloração, no entanto, não indica que o animal esteja adequadamente oxigenado. Assim, a avaliação desses sinais deve sempre ser associada à verificação de outros indicadores fisiológicos.

#### e. Temperatura corporal

O hipotálamo regula a temperatura corporal por mecanismos de *feedback*, como vasodilatação, vasoconstrição, alterações na ventilação, respiração ofegante e calafrios (BENNETT, LEWIS, 2022). A hipotermia é uma das complicações mais comuns durante a anestesia. Camundongos, por exemplo, são particularmente sensíveis devido à alta relação área de superfície/massa (NAVARRO *et al.*, 2021).

A mensuração da temperatura corporal de roedores durante um procedimento cirúrgico é essencial. Vários instrumentos de aferição da temperatura podem ser utilizados, devendo-se dar prioridade à utilização de aparelhos eletrônicos que fornecem maior

acurácia. A região anal ou retal geralmente é o local de escolha para posicionamento da sonda para aferição de temperatura em ratos e camundongos (NAVARRO *et al.*, 2021).

Destaca-se que equipamentos de aquecimento, como cobertores de ar forçado, cobertores de água aquecida circulante ou placas aquecedoras, devem estar próximos ao animal desde a sedação até a recuperação. Tal conduta diminui a perda de calor por radiação e convecção (SKORUPSKI *et al.*, 2017).

Outros recursos podem ser utilizados no monitoramento dos parâmetros fisiológicos dos animais durante os procedimentos cirúrgicos, entretanto, requerem equipamentos específicos para sua realização, como a capnografia, aferição da pressão arterial sistêmica e da pressão venosa sistêmica.

## 2.3 Pós-operatório

Esta etapa é de extrema importância para o sucesso cirúrgico e a rápida recuperação do paciente. O retorno do animal da sedação/anestesia é altamente variável, dependendo do protocolo utilizado, da duração do procedimento e da condição do paciente (BENNETT, LEWIS, 2022).

Assim, após a cirurgia, o animal deve ser mantido em local aquecido, sem ruídos e com intensidade luminosa reduzida (STASIAK *et al.*, 2003). Ademais, o piso e a parte inferior das paredes do recinto de recuperação devem ser acolchoados com toalhas ou cobertores, visto que os animais geralmente ficam instáveis quando começam a deambular (BENNETT, LEWIS, 2022).

Os sinais vitais devem ser monitorados a cada 10-15 minutos até que o animal esteja totalmente consciente e capaz de deambular. A hidratação com soluções salinas isotônicas e aquecidas (36–37°C) por via subcutânea ou intraperitoneal é recomendada durante a recuperação do animal, visando repor líquidos perdidos durante cirurgias, principalmente naquelas de longa duração (NAVARRO *et al.*, 2021).

Visto que procedimentos cirúrgicos potencialmente causam dor e estresse nos modelos experimentais durante o pós-operatório, podendo comprometer seriamente o bem-estar animal, principalmente aqueles com maior grau de invasividade, a supressão desse desconforto é imperativa nesta etapa (STASIAK *et al.*, 2003). Sinais clínicos de dor no pós-operatório devem ser monitorados sistematicamente para determinar a administração de analgésicos, cuja escolha deve ser feita de forma adequada, levando-se em consideração a espécie animal, o protocolo cirúrgico e o tempo de analgesia do fármaco.

A Escala de Grimace é um recurso particularmente útil na quantificação da dor no pós-operatório (MATSUMIYA *et al.*, 2012). Outras condições clínicas dos animais podem ser utilizadas para verificar a ocorrência de dor em camundongos e ratos nesta fase, como discutiremos no tópico 4 deste capítulo.

### 3 | PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS EM ROEDORES

Serão apresentados aqui, de forma genérica, alguns procedimentos cirúrgicos utilizados, majoritariamente, em ratos e camundongos para fins científicos. Vale destacar que os protocolos podem sofrer variações entre os diversos grupos de pesquisa. Todavia, a discussão a seguir poderá servir de orientação para o estabelecimento de protocolo cirúrgico experimental seguro e adequado, ao propiciar o reconhecimento de intercorrências cirúrgicas e tomadas de decisões que evitarão o sofrimento ou a dor relacionada ao procedimento escolhido.

#### 3.1 Cirurgias abdominais

Diversos modelos de doenças requerem cirurgias abdominais e, apesar de terem objetivos distintos, muitos protocolos apresentam características comuns, como a laparotomia, que configura acesso à cavidade abdominal, sendo uma cirurgia invasiva. Dependendo do objetivo e protocolo experimental, o pós-operatório poderá ser curto, compreendendo poucos dias, ou longo, podendo levar meses para a recuperação completa do animal.

Os principais procedimentos cirúrgicos abdominais incluem:

- Cirurgias renais (transplante renal, nefrectomia, ligação ou obstruções de vasos ou pedículos).
- Cirurgias hepáticas (hepatectomia, transplante hepático, ressecção parcial hepática [Figura 1], ligação de ducto biliar).
- Induções de estenoses no intestino.
- Procedimentos no timo e baço (timectomia e esplenectomia).
- Cirurgias no pâncreas (ligação do ducto pancreático e pancreatectomia).
- Cirurgias no sistema reprodutor (orquiectomia, ooforectomia, ovariosterectomia e ovariosalpingohisterectomia).

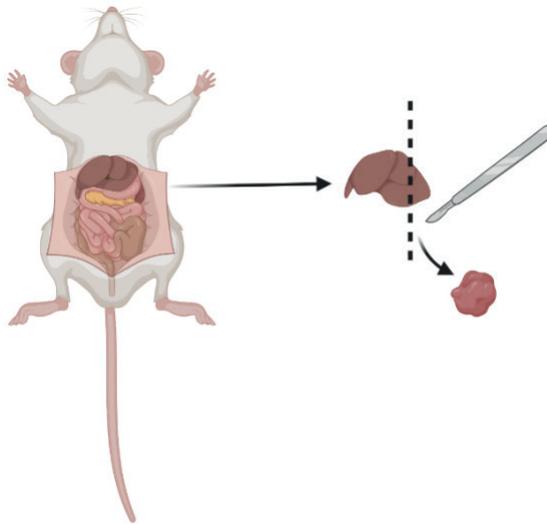


Fig.1: Disposição de órgãos abdominais em roedores após laparotomia e ressecção de fígado.

Fonte: Ribeiro, Almeida, Oliveira, 2023.

Na realização desses procedimentos, visando garantir um bom manejo da dor, é comum a adoção de protocolos analgésicos do tipo opioide antes da cirurgia. Um bom exemplo é o uso de buprenorfina (0.01 a 0.05 mg/kg) em ratos e camundongos, aplicado por via intraperitoneal entre 20 e 30 minutos antes do procedimento cirúrgico (GRAF, CINELLI, ARRAS 2016; TORELLI *et al.*, 2022). Nesta fase, outros fármacos também podem ser considerados para evitar efeitos adversos da anestesia ou para assegurar o plano anestésico adequado. Dentre eles, a acepromazina (2 mg/kg) é um bom exemplo de sedativo utilizado antes da indução anestésica em ratos e camundongos. Além disso, em muitos protocolos que promovem exposição de áreas com um alto nível de microrganismos, como o trato gastrointestinal, ou que induzam imunossupressão, pode ser indicado o uso de antibióticos no pré-operatório, como profilaxia. Entretanto, vale ressaltar que a antibioticoterapia não substitui procedimentos de assepsia (MIWA, SLADKY, 2016; GRAF, CINELLI, ARRAS, 2016).

Finalizados os procedimentos pré-operatórios, o protocolo cirúrgico pode ser iniciado a partir da indução anestésica. A vaporização de anestésicos (Figura 2) para inalação é comumente utilizada em ratos e camundongos, como é o caso do isoflurano, que pode ser utilizado em concentrações entre 4 e 5% para indução e de 1 a 2% para manutenção do plano anestésico, em associação com oxigênio medicinal (ZHANG *et al.*, 2019; ASHBY *et al.*, 2019). O uso de anestésico inalatório garante maior controle do plano anestésico, permitindo aprofundar ou reduzir a consciência do animal em poucos minutos.

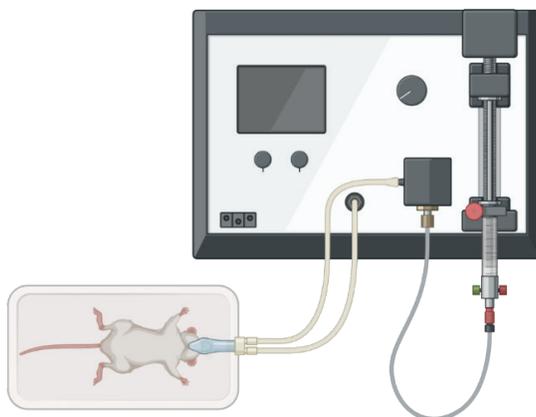


Fig.2: Sistema esquemático de anestesia inalatória em roedores.

Fonte: Ribeiro, Almeida, Oliveira, 2023.

Durante a execução do protocolo cirúrgico, parâmetros fisiológicos (temperatura, respiração e frequência cardíaca), sinais e condições clínicas devem ser monitorados e garantidos para evitar sofrimento ou procedimentos mal executados (BARRE-SINOUSI, MONTAGUTELLI, 2015). Ao finalizar o procedimento cirúrgico, o pós-operatório deve prever todos os cuidados citados no tópico 2.3.

### 3.2 Oclusão de vasos e pedículo

Na indução de isquemias, o fluxo sanguíneo deve ser interrompido a partir de uma intervenção cirúrgica, por isso, diversos protocolos ou oclusões de vasos para esse fim podem ser utilizados. Alguns procedimentos apresentam grau de invasividade menos severo, como, por exemplo, a oclusão de veia ou artéria femoral. Já outros podem ser mais invasivos, como a oclusão do pedículo renal para indução de síndrome cardiorenal, que requer acesso à cavidade abdominal, configurando-se como um protocolo cirúrgico de maior porte e complexidade (NERES-SANTOS *et al.*, 2021).

Protocolos anestésicos inalatórios podem ser utilizados, como já mencionado. No entanto, vale salientar que, apesar dos aparelhos de anestesia inalatória apresentarem diversas vantagens, a indisponibilidade desses equipamentos nas instituições promove o uso de anestésicos injetáveis em larga escala. Por essa razão, muitos grupos de pesquisa utilizam anestésicos injetáveis em diferentes combinações farmacológicas, sendo a mistura de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina a mais comum (NERES-SANTOS *et al.*, 2021). Apesar de os anestésicos injetáveis também serem eficientes em determinados protocolos cirúrgicos, devemos considerar possíveis intercorrências e interações medicamentosas que essas combinações podem apresentar, como, por exemplo, o uso

de anestésicos agonistas alfa adrenérgicos, que produzem efeito vasoconstritor periférico (STABILE *et al.*, 2003). A interferência de tais combinações em protocolos cirúrgicos pode causar também prejuízos respiratórios e cardiovasculares. No pós-operatório, o grau de invasividade da oclusão realizada deve ser considerado para estabelecimento de procedimentos analgésicos, utilização de anti-inflamatório e antibiótico.

### 3.3 Canulações

Em protocolos que visam à coleta de sangue de forma contínua ou infusões de drogas através de veias e artérias por um período considerável de tempo, comumente se utiliza um protocolo cirúrgico para fixar uma cânula ou um cateter de silicone de acesso a um vaso. A cânula é mantida no interior do vaso, a partir de uma sutura ou amarração realizada externamente a ele, permitindo uma fixação segura (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2011).

Nesse protocolo, a indução anestésica pode ser feita com isoflurano a 5% e a manutenção com isoflurano de 1% a 2%. Técnicas de assepsia devem ser previamente aplicadas no animal, além de avaliação da profundidade do plano anestésico, que poderá ser realizada por meio do pinçamento da pele na região interdigital (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2011). A tricotomia deve ser realizada, se necessária, utilizando um aparelho elétrico apropriado e, então, inicia-se a cirurgia.

Incisões cutâneas são realizadas, seguidas de dissecação muscular para exposição de vasos, como no caso de procedimentos realizados na aorta carótida ou na veia jugular. Através de uma pequena arteriotomia ou venotomia, a cânula é inserida em aproximadamente 12 mm e fixada com dois pontos de sutura, um distal e outro proximal à incisão realizada no vaso. Após a sutura de fixação, deve-se atentar ao fluxo sanguíneo ideal, evitando compressão e redução da luz do vaso com a cânula (VAN WINKLE *et al.*, 2013).

Visando manter a estabilidade e funcionalidade da cânula, é preciso fixá-la de modo a permitir a movimentação normal do animal e, ao mesmo tempo, longe do seu alcance, evitando o seu acesso. Com esse propósito, é comum fixar a cânula através da fáscia superficial no pescoço, lateralmente à parede corporal (Figura 3), com um fio de seda 4.0. Para isso, deve ser garantida folga suficiente para flexão do pescoço do animal. A cânula é levada até a porção posterior do pescoço, na região da nuca, onde é realizada uma pequena incisão para fixação com uma sutura e possibilitando o acesso externo com adaptador para conexão de seringa (VAN WINKLE *et al.*, 2013).



Fig. 3 - Cateter e/ou canulação esquemática de vasos em roedores.

Fonte: Ribeiro, Almeida, Oliveira, 2023.

Os cuidados pós-operatórios para os protocolos apresentados neste tópico devem ser considerados conforme citados anteriormente no item 2.3.

### 3.4 Cirurgia do sistema nervoso central e periférico em roedores

O desenvolvimento de estudos relacionados à neurociência se deve, dentre muitas técnicas, à habilidade de acesso a regiões específicas do encéfalo a partir de protocolos cirúrgicos conhecidos como estereotaxia (FORNARI *et al.*, 2012). Esse acesso tem permitido descobertas científicas de grande importância, uma vez que possibilita o estudo e manipulações do encéfalo em organismos vivos, permitindo a visualização de comportamentos e alterações fisiológicas em tempo real (FORNARI *et al.*, 2012; KEISER, CHEN, DAVIDSON, 2018;). A estereotaxia (Figura 4) possibilita a implantação de cânulas metálicas em uma região específica de interesse, permitindo, por exemplo, a infusão de vetores virais adeno-associados objetivando terapias gênicas; drogas de ação curta; infusões contínuas a partir de minibombas osmóticas e microdiálises para análise do fluido cefalorraquidiano, dentre outras aplicações (MESSIER, EMOND, ETHIER 1999; PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2011; FORNARI *et al.*, 2012; KEISER, CHEN, DAVIDSON, 2018). Todas essas metodologias excluem a barreira hematoencefálica que, muitas vezes, é um obstáculo considerável a diversos protocolos em neurobiologia (MESSIER, EMOND, ETHIER, 1999; FORNARI *et al.*, 2012; KEISER, CHEN, DAVIDSON 2018). Além disso, permitem a implantação de eletrodos para estimulação ou registros de sinais eletroencefalográficos e implantação de fibras ópticas para estudos relacionados à optogenética, dentre outras abordagens (FORNARI *et al.*, 2012).

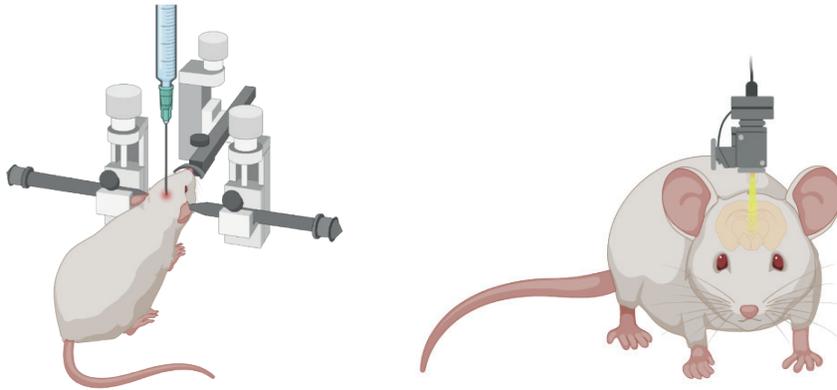


Fig. 4 - Aparato esquemático para estereotaxia e optogenética em roedores.

Fonte: Ribeiro, Almeida, Oliveira, 2023.

O que permite o acesso preciso a estruturas encefálicas é a referência de pontos superficiais presentes nos ossos craniais, como o bregma (ponto de encontro dos ossos frontal e parietais na intersecção das suturas sagital e coronal) e lambda (ponto de encontro dos ossos occipital e parietais na intersecção das suturas sagital e lambdoidal), quando o animal está posicionado no aparato estereotáxico (MESSIER, EMOND, ETHIER, 1999). A partir de um atlas para cirurgias estereotáxicas, é possível determinar as coordenadas anteroposterior (AP), médio-lateral (ML) e dorsoventral (DV) (FENG *et al.*, 2022).

O protocolo cirúrgico geral deve ser considerado, assim como discutido nos tópicos anteriores para as cirurgias abdominais, oclusões ou canulações de vasos. Porém, algumas características da cirurgia estereotáxica devem ser sublinhadas, como a precisão dos parâmetros necessários para acessar determinada região, uma vez que erros milimétricos podem comprometer a execução do protocolo cirúrgico (MESSIER, EMOND, ETHIER 1999; FENG *et al.*, 2022). Neste sentido, deve-se considerar a linhagem e idade do animal utilizado devido às variações anatômicas que podem comprometer as coordenadas pré-estabelecidas (FENG *et al.*, 2022). Ademais, deve-se considerar o volume injetado em uma determinada região, o qual pode variar devido ao tamanho e à estrutura neuroanatômica, visando promover dano tecidual mínimo (MESSIER, EMOND, ETHIER 1999; KEISER, CHEN, DAVIDSON, 2018). Assim, estudos pilotos e injeções com corantes podem ser necessários para padronizar e refinar o protocolo cirúrgico e, por conseguinte, reduzir o número de animais utilizados na pesquisa (MESSIER, EMOND, ETHIER 1999).

Acrílicos ou resinas odontológicas para fixação de cânulas ou conectores com eletrodos sobre o crânio devem ser utilizados com o máximo de cuidado, por serem neurotóxicos, uma vez que tal efeito deve ser evitado ou minimizado. Para que a adesão ocorra de forma apropriada e não se desprenda, é necessário que o osso do crânio

esteja devidamente limpo e seco antes da aplicação do acrílico odontológico. No caso de implantação de cânulas, um mandril deve ser inserido dentro da cânula para selar o interior durante o período em que não há manipulação ou infusões de líquidos, evitando contaminações ou entupimento da cânula guia (MESSIER, EMOND, ETHIER, 1999).

Protocolos cirúrgicos para estereotaxia permitem manutenções de cânulas, eletrodos e fibras ópticas no animal por dias, semanas e até meses. Entretanto, sugere-se manter o animal em recuperação entre 5 e 7 dias antes do início dos experimentos, evitando quaisquer interferências nos resultados obtidos (FORNARI *et al.*, 2012). Além disso, procedimentos pós-operatórios padrão para recuperação do plano anestésico devem ser considerados. Vale salientar que a maioria das cirurgias estereotáxicas são minimamente invasivas e a recuperação do animal é relativamente rápida (KEISER, CHEN, DAVIDSON, 2018).

Protocolos cirúrgicos para indução de lesão medular são recorrentes no campo da neurociência, apesar de serem considerados complexos devido ao grau de invasividade. Na execução desses protocolos, deve-se considerar o uso de analgésicos opioides cerca de 30 minutos antes do início da cirurgia, como buprenorfina 0.01 a 0.05 mg/kg (TORELLI *et al.*, 2022).

Na indução anestésica, sugere-se isoflurano a 5% e uma concentração de 1 a 2% para manutenção do plano anestésico, ambos acrescidos de oxigênio medicinal. Técnicas de assepsia e tricotomia devem ser adotadas. Em seguida, uma incisão é realizada na pele, que então deve ser divulsionada para acesso aos músculos. Incisões laterais à coluna são feitas e, com um afastador, a vértebra é acessada para uma laminectomia com posterior contusão ou lesão da medula. A lesão medular poderá ser obtida por meio de equipamento específico (Impactor, New Jersey, USA) que permite controle de altura e peso de um bastão metálico ao ser lançado em queda livre sobre a medula. Após a lesão, os músculos são suturados separadamente e a pele suturada em sequência (Figura 5) (TORELLI *et al.*, 2022; SANGANAHALLI *et al.*, 2021).

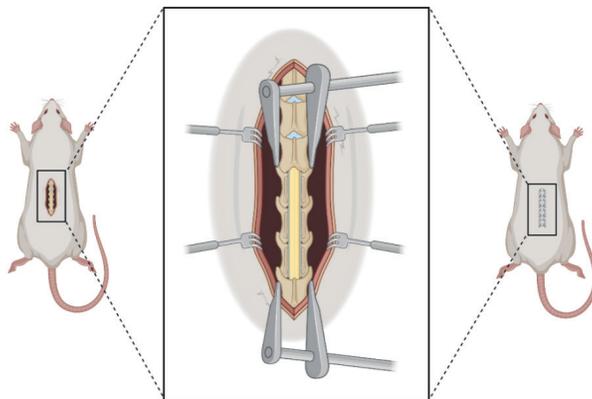


Fig. 5- Representação de acesso cirúrgico da medula espinal de roedores.

Fonte: Ribeiro, Almeida, Oliveira, 2023.

O fornecimento de isoflurano é interrompido ao fim do procedimento de lesão medular, contudo, o suprimento de oxigênio deve ser mantido por cerca de 5 a 15 minutos ou até o animal recuperar-se do plano anestésico. O pós-cirúrgico deve ser acompanhado atentamente com manejo de analgesia (buprenorfina 0.01 a 0.05 mg/kg a cada 8 horas) e antibiótico (amoxicilina 15 mg/kg). Nesse protocolo cirúrgico, deve-se verificar a eliminação urinária e, com frequência, será necessário realizar o esvaziamento da bexiga do animal por meio de massagens (duas ou três vezes ao dia), pois o fluxo urinário pode ser prejudicado. Hidratação subcutânea com salina e suplementação alimentar por via parenteral podem ser requeridas (SANGANAHALLI *et al.*, 2021; TORELLI *et al.*, 2022).

Em estudos relacionados à dor neuropática em ratos e camundongos, o procedimento de ligamentos em nervos periféricos (Figura 6) é essencial para reproduzir o modelo da doença, possibilitando estudos de mecanismo (ASHBY *et al.*, 2019).

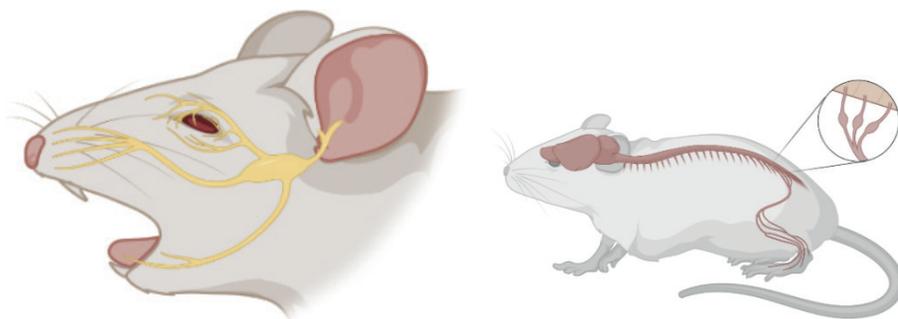


Fig. 6 - Esquema anatômico de nervos para acesso e indução de dor neuropática em roedores.

Fonte: Ribeiro, Almeida, Oliveira, 2023.

Neste sentido, podem ser considerados os procedimentos contidos nos protocolos cirúrgicos apresentados anteriormente neste capítulo. Nesse modelo experimental, os procedimentos objetivam a indução de nocicepção (sensibilização de vias que induzem desconforto e sensações dolorosas), o que frequentemente impossibilita o uso de analgésicos, que podem mascarar os resultados obtidos. Por essa razão, tais estudos necessitam de justificativas plausíveis (ASHBY *et al.*, 2019).

## 4 | AVALIAÇÃO E APLICAÇÃO DO PONTO FINAL HUMANITÁRIO EM CIRURGIA EXPERIMENTAL

Todos os procedimentos cirúrgicos comentados até o momento, bem como muitos outros modelos experimentais, podem, sob algumas circunstâncias, acabar resultando em sofrimento, dor e angústia aos animais. Em todos os casos, o pesquisador responsável e sua equipe deverão encerrar antecipadamente o estudo proposto. Esse desfecho precoce, chamado de ponto final humanitário (*endpoint*, do inglês), difere do encerramento normal de uma pesquisa, que ocorre quando os objetivos científicos foram alcançados, pois o primeiro deve ser adotado sempre em qualquer circunstância em que haja comprometimento significativo ao bem-estar animal. Dessa forma, o encerramento do estudo deve ser antecipado na tentativa de impedir o prolongamento desnecessário do sofrimento, visto que alterações no bem-estar animal impactam negativamente na confiabilidade dos dados de uma pesquisa (RICHMOND, 1999; MORTON, 2005; BRASIL, 2022).

Por definição, o ponto final humanitário é um indicador precoce de dor e/ou distresse (potenciais ou efetivos) em experimentos com animal, que pode ser usado para evitar ou aliviá-los, funcionando como ferramenta de refinamento, um dos princípios básicos dos 3R's de Russel e Burch (RICHMOND, 1999; OECD, 2000). Em suma, o ponto final humanitário é o ponto de referência de sinais característicos de dano ao bem-estar animal que impõe a necessidade de ações corretivas ou interruptivas imediatas. Vale ressaltar que os parâmetros humanitários devem sempre ser ponderados em relação aos objetivos científicos do estudo, de modo a permitir que estes sejam alcançados, desde que devidamente inseridos num contexto moral e eticamente justificados (OLFERT *et al.*, 1988; HENDRIKSEN, MORTON, 1999; ASHALL, MILLAR, 2014). Antes mesmo de submeter um projeto de pesquisa à apreciação pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) institucional, deve-se considerar a adoção de *endpoints* adequados para a espécie proposta no estudo. Para isso, é necessário prever todas as intercorrências potencialmente prejudiciais ao bem-estar animal durante a execução do protocolo, bem como ações corretivas ou interruptivas. A implementação de *endpoints* é imprescindível para evitar sofrimento prolongado e/ou excessivo, principalmente nos casos em que a dor ou o distresse é parte necessária do protocolo. Por outro lado, quando não for possível estimar o potencial de morbidade ou mortalidade de uma determinada abordagem experimental, é altamente recomendável

a adoção de estudos pilotos prévios, a fim de se obter parâmetros mais confiáveis na aplicação de *endpoints* ao protocolo experimental (OLFERT, 1995; OLFERT *et al.*, 1988).

Embora a eutanásia seja a estratégia de desfecho mais comumente utilizada na experimentação animal, essa deve ser a última alternativa possível a ser considerada. Ainda que o *endpoint* adequado dependa de cada cenário, em muitos casos, o alívio da dor, desconforto ou distresse pode ser obtido por meio de estratégias como analgesia, exclusão do animal afetado do estudo, cirurgia reparadora, alterações na quantidade de animais por gaiola, ajustes de temperatura, implementação de programas de enriquecimento ambiental, satisfação de necessidades sociais, disponibilização de animais para adoção, dentre outras opções (GONZALEZ *et al.*, 2000; LEACH, THORNTON, MAIN, 2008; CARBONE, 2012; SPANGENBERG, KEELING, 2016). Independentemente da estratégia adotada, na elaboração correta de um *endpoint* é indispensável o conhecimento do comportamento normal e de indicativos de alterações comportamentais na espécie animal (OECD, 2000).

Por outro lado, em estudos em que a morte do animal é a única opção de desfecho, é importante salientar que o método de eutanásia a ser aplicado deve ser adequado à espécie e à idade do sujeito experimental (BRASIL, 2018). Métodos aceitos sob restrição, como a decapitação por guilhotina, por exemplo, podem ser utilizados em alguns protocolos de pesquisa, desde que justificados e devidamente aprovados pela CEUA competente, a qual julgará, inclusive, os méritos éticos e científicos da pesquisa. Nesses casos, é de fundamental importância que sejam previstas antecipadamente todas as situações possíveis e seus desfechos humanitários, a fim de evitar o sofrimento animal.

Na aplicação de um *endpoint*, é imprescindível que haja a observação do bem-estar animal, que pode ser avaliado por meio de indicadores clínico-comportamentais, patofisiológicos e/ou bioquímicos. Atividade, postura corporal, agressividade, resposta ao manuseio, vocalização, *grooming* e estereotípias são exemplos de parâmetros clínico-comportamentais que podem ser avaliados. Alterações na frequência cardiorrespiratória, na contagem de células sanguíneas e no peso corpóreo, bem como a perda de hidratação e a anúria podem ser importantes marcadores patofisiológicos. Por sua vez, a avaliação de proteínas de fase aguda, catecolaminas, corticosteroides e hormônios como insulina, glucagon e prolactina são importantes parâmetros bioquímicos que, em conjunto com os parâmetros comportamentais e patofisiológicos, podem ser utilizados como critérios de decisão para ponto final humanitário.

Adicionalmente às evidências clínicas e comportamentais (possivelmente as mais facilmente observáveis), alguns parâmetros hormonais têm sido utilizados para mensurar o sofrimento animal, tais como catecolaminas, corticosteroides, prolactina, fator de necrose tumoral, interleucinas, dentre outros (OLFERT *et al.*, 1988). É importante notar que, em determinados casos, alterações clínico-comportamentais podem ser, na verdade, consequências tardias de falhas na manutenção da homeostase em resposta ao estresse (MCEWEN, 2003; MCEWEN, SEEMAN 1999, 2000; MCEWEN, WINGFIELD 2003a;

MCEWEN, WINGFIELD 2003b). Em certos casos, tais alterações poderiam ser detectadas precocemente por métodos bioquímicos, moleculares ou outros, especialmente quando o protocolo de pesquisa prevê coleta sanguínea (OLFERT *et al.*, 1988). De qualquer modo, independentemente do método de avaliação, o ponto final humanitário deve ser aplicado o mais precocemente possível, a fim de evitar que os animais atinjam um estado moribundo ou de morte iminente (HENDRIKSEN, MORTON, 1999). Dessa forma, o emprego tardio do ponto final humanitário pode caracterizar-se como uma negligência inconcebível e grave ao bem-estar animal.

A aplicação verdadeiramente eficaz (e, portanto, ética) do ponto final humanitário depende diretamente dos pesquisadores nos quesitos experiência e aptidão em distinguir características normais e anormais da espécie, capacitação, treinamento, engajamento, dedicação e senso de responsabilidade; e tais premissas se aplicam a todos os indivíduos envolvidos no uso e cuidado dos animais, o que inclui pesquisadores, colaboradores técnicos e discentes (HAU, 1999; OLFERT *et al.*, 1988; OLFERT, 1995).

A experiência do pessoal envolvido com a pesquisa com biomodelos é importante para o reconhecimento de algumas situações não convencionais, visto que algumas espécies são incapazes de manifestar alterações físicas e/ou comportamentais, mesmo em situações de angústia e/ou dor severa (OECD, 2000). Em camundongos submetidos a pequenas cirurgias, por exemplo, apenas sinais de dor e sofrimento consideráveis são normalmente detectáveis no pós-operatório, tais como piloereção, postura curvada, apatia, agressividade e automutilação (BAUMANS *et al.*, 1994; HAWKINS, 2002; BAUMANS, 2004; VAN SLUYTERS, OBERNIER, 2004). Portanto, para a aplicação adequada de um *endpoint*, é necessário que haja um constante e minucioso monitoramento do bem-estar por parte da equipe durante todo o experimento, através de estratégias de avaliação, como o uso de *checklists* ou escalas adequadas para cada espécie e cada procedimento (MORTON, 2005). Tais instrumentos devem considerar os parâmetros preditivos específicos a serem avaliados e a atribuição de escores a fim de minimizar a subjetividade da análise, conforme exemplo no quadro 2.

Os parâmetros devem ser registrados individualmente para cada animal e os escores obtidos deverão ser somados. O resultado dessa soma será considerado de acordo com uma faixa previamente estabelecida (e devidamente validada) de comprometimento do bem-estar do animal. Por sua vez, cada faixa de comprometimento determinará as ações a serem tomadas.

Parâmetro	Id animal: _____	Escore	Data/hora	Data/hora
Perda de peso	Normal a 5%	0		
	5 a 10%	1		
	Acima de 10%	2		
Comportamento	Normal	0		
	Letargia	1		
	Agressividade/Apatia	2		
	Agressividade elevada/Irresponsividade	3		
Pele	Hidratada	0		
	Desidratação leve	1		
	Desidratação moderada	2		
	Desidratação grave	4		
Pelos	Limpo	0		
	Ausência de <i>Grooming</i>	1		
	Sujeira e acúmulo de descargas oculares e/ou nasais	2		
	Sujidade extrema	4		
Respiração	Normal	0		
	Levemente desconfortável	1		
	Forçada e/ou Sibilante	4		
<b>Outras observações</b>				
<b>TOTAL</b>				

Quadro 2. Exemplo de proposta simplificada para avaliação de animais cirurgiados<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Adaptado de HAWKINS *et al.*, 2011.

A soma dos escores determinará o grau de comprometimento do bem-estar animal e a ação requerida:

- 0 => padrão de normalidade;
- 1 a 3 escores => faixa de comprometimento leve => manter a observação;
- 4 a 7 escores => faixa de comprometimento moderado=> aumentar a frequência de observação e considerar uso de analgésicos e sedativos ou outras estratégias;
- 8 a 11 escores => faixa de comprometimento grave => consultar médico veterinário, cogitar medida de alívio imediato e considerar *endpoint*;
- 12 a 17 escores => faixa de comprometimento gravíssimo => *endpoint* inadiável.

O monitoramento deve ser realizado de maneira cuidadosa, seguindo os passos a seguir:

- **Observação do comportamento espontâneo do animal no seu microambiente.** Essa análise deve ser de forma silenciosa, no horário em que estão habitualmente

despertos, verificando aspectos como atividade, locomoção, pelagem, comportamento, postura, tamanho, peso e condição geral. Por exemplo, é comum que animais em sofrimento se mantenham isolados dos demais ou se tornem agressivos e/ou apresentem posturas curvas, pelos eriçados, magreza excessiva etc. Essa análise deve ser a mais discreta possível para evitar estresse dos animais com consequente alteração do comportamento.

- **Avaliação individual.** Nesta etapa, convém avaliar cada animal que esteja apresentando aspectos incomuns (normalmente visualizáveis já no passo anterior), observando minuciosamente o animal por inteiro: cabeça, abdômen, dorso, cauda, patas, focinho, olhos, vibrissas e orelhas; bem como coloração, presença e tamanho de massas tumorais, alopecia, caquexia, presença de secreções ou sinais de luta etc.

- **Notificação do médico-veterinário responsável.** A constatação de quaisquer alterações deve ser imediatamente comunicada ao médico veterinário responsável, que deverá investigar a causa e decidir qual intervenção deverá ser tomada.

- **Registro das alterações e atribuição de escores.** Todas as alterações devem ser devidamente registradas, avaliadas e classificadas segundo uma escala de escores previamente definida, de acordo com a intensidade, para cada parâmetro escolhido.

- **Mensurar o grau de comprometimento do bem-estar animal.** Esse dado será resultado da soma dos escores e o valor obtido deve indicar a faixa de comprometimento do bem-estar correspondente, bem como a ação requerida. Quanto maior o somatório, pior o estado do animal.

- **Executar *endpoint*.** Para cada faixa de comprometimento, uma intervenção específica deverá ser tomada, sendo a eutanásia a medida mais extrema. Nesta etapa, diversas ações podem ser requeridas com o objetivo de restabelecer o bem-estar animal, como, por exemplo, a adoção de tratamento sintomático/de suporte e ajuste do protocolo experimental. Quando a recuperação não for possível, a participação do animal no experimento deverá ser interrompida. Dependendo do comprometimento de seu bem-estar, a eutanásia deverá ser considerada. Em todo caso, tal decisão deve ser tomada após uma devida avaliação clínica que considere a gravidade da condição, quantidade de dor e sofrimento, o prognóstico e a potencial perda de dados relevantes para a pesquisa (OECD, 2000).

A seguir, uma lista de alguns sinais clínicos que, a depender da duração, gravidade e da resposta à terapia, podem ser fortes indicadores da necessidade de finalização humanitária para a maioria das espécies de animais de laboratório (NIH, 2022):

- Perda de peso rápida ou progressiva;
- anorexia e/ou ingestão insuficiente de líquidos;
- diarreia debilitante;
- pele desidratada;

- aumento da circunferência abdominal ou ascite;
- dermatites ou outras condições irresponsivas ao tratamento;
- acúmulo de sujeira no pelo e/ou postura curvada;
- letargia;
- perda do reflexo de correção ou falha em manter o equilíbrio;
- tosse, respiração forçada, descarga nasal, ofegância;
- icterícia, cianose e/ou palidez/anemia;
- sinais neurológicos (convulsões, paralisia, paresia, andar em círculos/inclinação da cabeça, cegueira);
- sangramentos espontâneos;
- trauma autoinduzido com exposição do músculo subjacente;
- qualquer outra condição que interfira em atividades normais (como comer e beber, construir ninhos, caminhar etc.);
- hipertermia ou Hipotermia excessivas ou prolongadas; e
- outros.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Todo protocolo que envolva o uso de biomodelos animais, especialmente aqueles relacionados a procedimentos cirúrgicos invasivos, deve ser cientificamente relevante e eticamente justificável.
- Pesquisadores devem priorizar o refinamento de técnicas cirúrgicas a fim de minimizar a dor ou o estresse dos animais.
- Protocolos devem ser constantemente revistos, visando detectar comprometimento no bem-estar dos animais.
- Em caso de ocorrência de sofrimento, dor e angústia nos animais, é inescusável que sejam adotados critérios de *endpoint* conforme legislação vigente.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-HALIM, R. E. Contributions of Ibn Zuhr (Avenzoar) to the progress of surgery: a study and translations from his book Al-Taisir. **Saudi Medical Journal**, 26(09): 1333-1339, 2005.

ASHALL, V. & MILLAR, K. Endpoint matrix: a conceptual tool to promote consideration of the multiple dimensions of humane endpoints. **ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation**, 31(2): 209-213, 2014.

ASHBY, D. M.; LEDUE, J.; MURPHY, T. H.; MCGIRR, A. Peripheral Nerve Ligation Elicits Widespread Alterations in Cortical Sensory Evoked and Spontaneous Activity. **Scientific Reports**, 9(1): 1-10, 2019.

BARRE-SINOUSSE, F. & MONTAGUTELLI, X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. **Future Science OA**, 1(4), 2015.

BAUMANS, V. Methods for evaluation of laboratory animal well-being. **Alternatives to Laboratory Animals**, 32(1\_suppl), 161-162, 2004.

BAUMANS, V.; BRAIN, P. F.; BRUGERE, H.; CLAUSING, P.; JENESKOG, T. & PERRETTA, G. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs: Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and Distress accepted by the FELASA Board of Management November 1992. **Laboratory Animals**, 28(2): 97-112, 1994.

BENNETT, K. & LEWIS, K. Sedation and Anesthesia in Rodents. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, 25(1): 211-255, 2022.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, 15 fev. 2018. Disponível em: [https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/legislacao/Arquivos/Anexo\\_Res\\_Norm\\_37\\_2018\\_CONCEA\\_Pratica\\_Eutanasia.pdf](https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/legislacao/Arquivos/Anexo_Res_Norm_37_2018_CONCEA_Pratica_Eutanasia.pdf). Acesso em: 11 dez. 2022.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Resolução nº 55, de 5 de outubro de 2022**. Atualiza o texto da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, 07 out. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-55-de-5-de-outubro-de-2022.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2022.

CARBONE, L. Pain management standards in the eighth edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 51(3), 322-328, 2012.

FENG, Z.; LI, A.; GONG, H. & LUO, Q. Constructing the rodent stereotaxic brain atlas: a survey. **Science China Life Sciences**, 65, 1-14, 2022.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B. & BARBOSA, M. V. J. **Modelos experimentais em pesquisa**. Acta Cirúrgica Brasileira, 20(2): 28-34, 2005.

FLECKNELL, P. **Laboratory animal anaesthesia**. Amsterdam: Academic press, 2015.

FORNARI, R. V.; WICHMANN, R.; ATSAK, P.; ATUCHA, E.; BARSEGYAN, A.; BELDJOUH, H.; MESSANVI, F.; THURING, C. M. A. & ROOZENDAAL, B. Rodent stereotaxic surgery and animal welfare outcome improvements for behavioral neuroscience. **Journal of Visualized Experiments**, 59: e3528, 2012.

GONZALEZ, M. I.; FIELD, M. J.; BRAMWELL, S.; MCCLEARY, S. & SINGH, L. Ovariohysterectomy in the rat: a model of surgical pain for evaluation of pre-emptive analgesia? **Pain**, 88(1): 79-88, 2000.

GRAF, R. P.; CINELLI, P. & ARRAS, M. Morbidity scoring after abdominal surgery. **Laboratory Animals**, 50(6): 453-58, 2016.

HAU, J. Humane endpoints and the importance of training. In: Hendriksen CFM & Morton DB. (Eds). **Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research. Proceedings of the International Conference**, 22-25 November 1998, Zeist, The Netherlands. London: The Royal Society of Medicine Press, 1999. p. 71-74.

HAWKINS, P. Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. **Laboratory Animals**, 36(4): 378-395, 2002.

HAWKINS, P.; MORTON, D. B.; BURMAN, O.; DENNISON, N.; HONESS, P.; JENNINGS, M.; LANE, S.; MIDDLETON, V.; ROUGHAN, J. V.; WELLS, S. & WESTWOOD, K. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVA/AVF/RSPCA/UFWA Joint Working Group on Refinement. **Laboratory Animals**, 45(1): 1-13, 2011.

HENDRIKSEN, C. F. M.; MORTON, D. B. (Eds.). **Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research**. Proceedings of the International Conference, 22-25 Nov 1998 Zeist, The Netherlands. London: Royal Society of Medicine Press, 1999, 150 pp.

HINES, G. L. Blalock-Taussig Shunt at 75 a landmark operation and a triumph of diversity over prejudice. **Cardiology in Review**, 27(5): 219-21, 2019.

JAVID, P.; AYDIN, A.; MOHANNA, P. N.; DASGUPTA, P. & AHMED, K. Current status of simulation and training models in microsurgery: A systematic review. **Microsurgery**, 39(7): 655-668, 2019.

KEISER, M. S.; CHEN, Y. H. & DAVIDSON, B. L. Techniques for Intracranial Stereotaxic Injections of Adeno-Associated Viral Vectors in Adult Mice. **Current Protocols in Mouse Biology**, 8(4): e57, 2018.

LEACH, M. C.; THORNTON, P. D.; MAIN, D. C. J. Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare. **Animal Welfare**, 17(2): 161-170, 2008.

LOH, C. Y. Y.; WANG, A. Y. L.; TIONG, V. T. Y.; ATHANASSOPOULOS, T.; LOH, M.; LIM, P.; KAO, H. K. Animal models in plastic and reconstructive surgery simulation—a review. **Journal of Surgical Research**, 221: 232-245, 2018.

MATSUMIYA, L. C.; SORGE, R. E.; SOTOCINAL, S. G.; TABAKA, J. M.; WIESKOPF, J. S.; ZALOUM, A.; KING, O. D. & MOGIL, J. S. Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 51(1): 42-49, 2012.

MCEWEN, B. S. Mood disorders and allostatic load. **Biological Psychiatry**, 54(3): 200-207, 2003.

MCEWEN, B. S. & SEEMAN, T. Protective and damaging effects of mediators of stress elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Science**, 869(1): 30-47, 1999.

MCEWEN, B. S. & WINGFIELD, J. C. Response to commentaries on the concept of allostasis. **Hormones and Behavior**, 43(1): 28-30, (2003b).

MCEWEN, B. S. & WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior**, 4(1): 2-15, 2003a.

MESSIER, C.; EMOND, S. & ETHIER, K. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in the mouse. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, 63(2): 313-318, 1999.

MIWA, Y. & SLADKY, K. K. Small Mammals: Common Surgical Procedures of Rodents, Ferrets, Hedgehogs, and Sugar Gliders, **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, 19(1): 205-44, 2016.

MORTON, D. B. Guia para El punto final humanitário en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos. **Laboratory Animals**, 8: 5-12, 2005.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH). **Guidelines for Endpoints in Animal Study Proposals Issuing Office: OACU**; 2022. Disponível em: [https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2022-04/b13\\_endpoints\\_guidelines.pdf](https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2022-04/b13_endpoints_guidelines.pdf). Acesso em: 11 dez. 2022.

NAVARRO, K. L.; HUSS, M.; SMITH, J. C.; SHARP, P.; MARX, J. O.; PACHARINSAK, C. Mouse Anesthesia: The Art and Science. **ILAR Journal**, 62(1-2): 238-273, 2021.

NERES-SANTOS, R. S.; JUNHO, C. V. C.; PANICO, K.; CAIO-SILVA, W.; PIERETTI, J. C.; TAMASHIRO, J. A.; SEABRA, A. B.; RIBEIRO, C. A. J.; CARNEIRO-RAMOS, M. S. Mitochondrial Dysfunction in Cardiorenal Syndrome 3: Renocardiac Effect of Vitamin C. **Cells**, 10(11): 3029, 2021.

OECD. **Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation**. Paris: OECD; 2000. Acesso em: 11 dez. 2022.

OLFERT, E.; BHASIN, J.; LATT, R.; MACALLUM, E.; MCCUTCHEON, K.; RAINNIE, D. & SCHUNK, M. CCAC Guidelines on: Choosing an Appropriate Endpoint in Experiments Using Animals for Research. **Teaching and Testing**, 1988.

OLFERT, E. D. Defining an Acceptable Endpoint in Invasive Experiments. **Animal Welfare Information Center Newsletter**, 6(1): 3-7, 1995.

PRITCHETT-CORNING, K. R.; LUO, Y.; MULDER, G. B. & WHITE, W. J. Principles of rodent surgery for the new surgeon. **Journal of Visualized Experiments**, 47(6): e2586, 2011.

RICHMOND, J. Criteria for humane endpoints. In: HENDRIKSEN, C. F. M. & MORTON, D. B. (Eds.). **Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research**. Proceedings of the International Conference, 22-25 November 1998, Zeist, The Netherlands. London: The Royal Society of Medicine Press; 1999. p. 26-32.

SANGANAHALLI, B. G.; CHITTURI, J.; HERMAN, P.; ELKABES, S.; HEARY, R.; HYDER, F.; KANNURPATTI, S. S. Supraspinal sensorimotor and pain-related reorganization after a hemicontusion rat cervical spinal cord injury, **Journal of Neurotrauma**, 38(24): 3393-405, 2021.

SCHOLLMEYER, T.; SOYINKA, A. S.; SCHOLLMEYER, M. & MEINHOLD-HEERLEIN, I. Georg Kelling (1866-1945): the root of modern day minimal invasive surgery. A forgotten legend? **Archives of Gynecology and Obstetrics**, 276(5): 505-9, 2007.

SINGH, V. K.; SEED, T. M. **How necessary are animal models for modern drug discovery?** Expert Opinion on Drug Discovery, 16(12): 1391-1397, 2021.

SKORUPSKI, A. M.; ZHANG, J.; FERGUSON, D.; LAWRENCE, F. & HANKENSON, F. C. Quantification of induced hypothermia from aseptic scrub applications during rodent surgery preparation. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 56(5): 562-569, 2017.

SPANGENBERG, E. M. & KEELING, L. J. Assessing the welfare of laboratory mice in their home environment using animal-based measures – a benchmarking tool. **Laboratory Animals**, 50(1):30-38, 2016.

STABILE, E.; BURNETT, M. S.; WATKINS, C.; KINNAIRD, T.; BACHIS, A.; LA SALA, A.; MILLER, J. M.; SHOU, M.; EPSTEIN, S. E. & FUCHS, S. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. **Circulation**, 108(2): 205-10, 2003.

STASIAK, K. L.; MAUL, D.; FRENCH, E.; HELLYER, P. W. & VANDEWOUDE, S. Species-specific assessment of pain in laboratory animals. Contemporary Topics in **Laboratory Animal Science**, 42(4):13–20, 2003.

TORELLI, A. G.; CRISTANTE, A. F.; DE BARROS-FILHO, T. E. P.; DOS SANTOS, G. B.; MORENA, B. C.; CORREIA, F. F. & PASCHON, V. Effects of ganglioside GM1 and erythropoietin on spinal cord injury in mice: Functional and immunohistochemical assessments. **Clinics**, 77: 100006, 2022.

ULLMAN-CULLERE, M. H. & FOLTZ, C. J. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. **Laboratory Animal Science**, 49:319-23, 1999.

VAN SLUYTERS, R. C. & OBERNIER, A. Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science / American Association for Laboratory Animal Science**, 43(2): 48-52, 2004.

VAN WINKLE, J. A.; CHEN, B.; LEI, I. F.; PEREIRA, B.; RAJPUT, P. S. & LYDEN, P. D. Concurrent middle cerebral artery occlusion and intra-arterial drug infusion via ipsilateral common carotid artery catheter in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, 213(1): 63-69, 2013.

ZHANG, J.; BI, J. J.; GUO, G. L.; YANG, L.; ZHU, B.; ZHAN, G. F.; LI, S.; HUANG, N. N.; HASHIMOTO, K.; YANG, C. & LUO, A. L. Abnormal composition of gut microbiota contributes to delirium-like behaviors after abdominal surgery in mice. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, 25(6): 685-696, 2019.